

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **09163984 A**

(43) Date of publication of
application: **24. 06 . 97**

(51) Int. Cl

C12N 15/09
C12M 1/00
C12M 1/42
C12N 5/10
C12N 13/00
// B23K 26/00

(21) Application number: **08268451**

(22) Date of filing: **09 . 10 . 96**

(30) Priority: **12 . 10 . 95 JP 07264435**

(71) Applicant: **SONY CORP**

(72) Inventor: **KUBOTA SHIGEO**

BUERUNAA BUIHIMAN
RIN I RIYUU

**(54) LASER APPARATUS FOR GENE
RECOMBINATION AND RECOMBINATION
OF GENE USING THE SAME**

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To bore a hole for injecting an exogenous gene into a cell of a higher plant for transformation through a cell wall readily in high yield.

SOLUTION: This laser apparatus comprises an optical system composed of at least a semiconductor laser 10, a neodymium/YAG crystal 11 for converting the wavelength of the laser beam, an acousto-optic element 12, an LBO 13, β-BBO 14 and 15 and a lens 17 for condensing the laser beam subjected to

short-wavelength conversion and a stage 19 means for fixing the condensed point of the laser beam focused by the lens 17 at an arbitrary position on a specimen 18. Further, a light energy focused on the specimen 18 is set larger than a bond energy of a substance constituting a cell wall to constitute the objective laser apparatus for gene recombination. The laser beam of the semiconductor 10 is converted to the fifth harmonic of neodymium/YAG laser at 213nm wavelength and the second harmonic at 532 wavelength generated in the conversion process is used as a positioning means.

COPYRIGHT: (C)1997,JPO

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-163984

(43)公開日 平成9年(1997)6月24日

(51)Int.Cl.*	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 12 N 15/09		9282-4B	C 12 N 15/00	A
C 12 M 1/00			C 12 M 1/00	A
1/42			1/42	
C 12 N 5/10			C 12 N 13/00	
13/00			B 23 K 26/00	A

審査請求 未請求 請求項の数15 OL (全 6 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平8-268451
(22)出願日 平成8年(1996)10月9日
(31)優先権主張番号 特願平7-264435
(32)優先日 平7(1995)10月12日
(33)優先権主張国 日本 (JP)

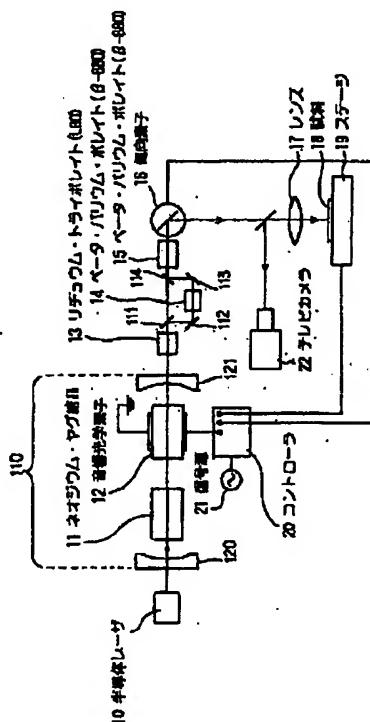
(71)出願人 000002185
ソニー株式会社
東京都品川区北品川6丁目7番35号
(72)発明者 久保田 重夫
東京都品川区北品川6丁目7番35号ソニー
株式会社内
(72)発明者 ヴェルナー ヴィヒマン
東京都品川区北品川6丁目7番35号ソニー
株式会社内
(72)発明者 リン イ リュウ
東京都品川区北品川6丁目7番35号ソニー
株式会社内

(54)【発明の名称】 遺伝子組替え用レーザ装置およびこれを用いた遺伝子組替え方法

(57)【要約】

【課題】 高等植物の形質転換のために細胞に外因性遺伝子を注入する孔を、細胞壁に容易に収率よく穿孔する。

【解決手段】 半導体レーザ10と、そのレーザ光を波長変換するネオジウム・ヤグ結晶11、音響光学素子12、LBO13、 β -BBO14、15と、短波長変換されたレーザ光を集光するレンズ17とからなる光学系と、レンズ17によって集光されたレーザ光の集光点を、試料18上の任意の位置に定めるステージ19手段とで構成され、更に、試料18上に集光された光のエネルギーは細胞壁を構成する物質の結合エネルギーよりも大きく設定して遺伝子組替え用レーザ装置を構成する。半導体レーザ10のレーザ光は波長213nmのネオジウム・ヤグレーザの第5高調波に変換され、また、その過程で生じる波長532nmの第2高調波を位置決め手段として用いる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 少なくともレーザ光源と、前記レーザ光源をパルス制御する手段と、前記レーザ光源から発するレーザ光を短波長変換する手段と、前記短波長変換されたレーザ光を集光するレンズとなる光学系と、前記レンズによって集光されたレーザ光の集光点を、標本上の任意の位置に定める手段とで構成され、更に、前記標本上で集光されたレーザ光のエネルギーは標本細胞壁を構成する物質の結合エネルギーよりも大きく設定したことを特徴とする遺伝子組替え用レーザ装置。

【請求項2】 前記標本上に集光されるレーザ光の波長は、300nm以下の遠紫外光であることを特徴とする、請求項1に記載の遺伝子組替え用レーザ装置。

【請求項3】 前記パルス制御手段は、そのパルス継続時間を、前記標本上に集光するレーザ光が前記標本細胞壁を貫通可能な時間に設定したことを特徴とする、請求項1に記載の遺伝子組替え用レーザ装置。

【請求項4】 前記レーザ光源は、半導体レーザからのレーザ光によって励起されるNd:YAGレーザであることを特徴とする、請求項1に記載の遺伝子組替え用レーザ装置。

【請求項5】 前記パルス制御手段のパルス発生タイミングと、前記光学系からのレーザ光の前記標本上での位置決めタイミングとの同期をとる手段を備えたことを特徴とする、請求項1に記載の遺伝子組替え用レーザ装置。

【請求項6】 前記短波長変換されたレーザ光は、前記Nd:YAGの第5高調波であることを特徴とする、請求項4に記載の遺伝子組替え用レーザ装置。

【請求項7】 前記標本上に集光されるレーザ光の波長は、波長213nmの遠紫外光であることを特徴とする、請求項2に記載の遺伝子組替え用レーザ装置。

【請求項8】 前記位置決めを行うために、前記第5高調波発生過程で生じる第2高調波を用いて前記標本の位置検出を行うことを特徴とする、請求項6に記載の遺伝子組替え用レーザ装置。

【請求項9】 固体レーザ媒質と、前記固体レーザ媒質からのレーザ光をパルス制御する手段と、前記パルス制御された前記固体レーザ媒質からのレーザ光を短波調に変換する第1の非線形光学結晶と、前記第1の非線形光学結晶から波長変換されたレーザ光を更に短波調に変換する第2の非線形光学結晶と、前記固体レーザ媒質からのレーザ光と前記第2の非線形光学結晶からのレーザ光とを組み合わせたレーザ光を更に短波調に変換する第3の非線形光学結晶と、前記第3の非線形光学結晶からのレーザ光を集光するレ

ンズとからなる光学系と、

前記レンズによって集光されたレーザ光の集光点を、標本細胞上の任意の位置に定める手段とで構成され、前記集光されたレーザ光により前記標本の細胞壁を穿孔することを特徴とする遺伝子組替え用レーザ装置。

【請求項10】 更に、前記パルス制御手段のパルス発生タイミングと、前記光学系からのレーザ光の前記標本上での位置決めタイミングとの同期をとる手段を備えたことを特徴とする、請求項9に記載の遺伝子組替え用レーザ装置。

【請求項11】 更に、前記標本の位置を検出する手段を備えたことを特徴とする、請求項9に記載の遺伝子組替え用レーザ装置。

【請求項12】 形質転換させる標本細胞に対し、レーザ光を照射して前記標本の細胞壁を穿孔し、穿孔した孔から外因性遺伝子物質を入れた溶液を前記細胞内に注入することにより、前記外因性遺伝子のコード発現を行うことを特徴とする遺伝子組替え方法。

【請求項13】 前記レーザ光の波長は、300nm以下の遠紫外光であることを特徴とする、請求項12に記載の遺伝子組替え方法。

【請求項14】 前記レーザ光は、固体レーザ媒質からのレーザ光の第5高調波であることを特徴とする、請求項12に記載の遺伝子組替え方法。

【請求項15】 前記固体レーザ媒質は、半導体レーザ素子からのレーザ光により励起されるNd:YAGであることを特徴とする、請求項14に記載の遺伝子組替え方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は例えば高等植物の形質転換に用いられる装置に関し、更に詳しくは外因性遺伝子を注入するために、植物の細胞壁に孔を開ける遺伝子組替え用レーザ装置と、これを用いた遺伝子組替え方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 従来、高等植物の形質転換には、例えば、成熟植物の穂から分離した種子より未成熟胚を取り出して培養する、或いは種皮を除去した種子を発芽させ、苗から分裂性盤状組織を切り取って得た細胞に、米国特許5149655号「Apparatus for genetic transportation」に開示されているように、核酸構築体の複製物を塗布した不活性担体粒子を加速して注入する手段により、得られた胚や盤状組織を栽培する方法、即ち、粒子媒介形質転換方法が採られてきた。

【0003】 ところで、このような粒子媒介形質転換においては、植物細胞は主としてセルロースからなる非常に固い繊維質と間隙をうめるブクチン質薄膜からなる厚さ数μmの細胞壁で保護されているから、この細胞壁を

打ち破って直径 $1\text{. }2\mu\text{m}$ 程度のタングステンや金粒子を胚に物理的に打ち込む必要があり、そのためにピストルやエアライフル等が用いられてきた。

【0004】しかしながら、ピストルやエアライフル等で粒子媒介形質転換を行うと、打ち込む粒子のエネルギーで胚細胞そのものが破壊される虞れがあり、收率は必ずしも高いものではなく、従って、その対策として胚細胞や核酸構築体の複製物を大量に用意する必要があった。また、ピストルやエアライフル等を使用するには危険性が伴い、更に、銃砲火薬取扱の認可を取得しなければならず、それに伴う煩雑さは多大なものがあった。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】従って本発明は、胚細胞や核酸構築体の複製物の收率を高くすると共に、ピストルやエアライフル等を使用する場合の危険性や許認を得る煩雑さを除去し、遺伝子組替え作業を効率的に行えるようにしようとするものである。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明はかかる課題に鑑みなされたものであって、少なくともレーザ光源と、前記レーザ光源をパルス制御する手段と、前記レーザ光源から発するレーザ光を短波長変換する手段と、前記短波長変換されたレーザ光を集光するレンズとからなる光学系と、前記レンズによって集光されたレーザ光の集光点を、標本上の任意の位置に定める手段とで構成され、更に、前記標本上で集光されたレーザ光のエネルギーは標本細胞壁を構成する物質の結合エネルギーよりも大きく設定した遺伝子組替え用レーザ装置を構成する。

【0007】前記標本上に集光されるレーザ光の波長は、 300 nm 以下の遠紫外光であること、特に波長 213 nm の遠紫外光を用いること。

【0008】前記パルス制御手段は、そのパルス継続時間を、前記標本上に集光するレーザ光が前記標本細胞壁を貫通可能な時間に設定すること。

【0009】前記レーザ光源は、半導体レーザからのレーザ光によって励起される Nd : YAG レーザであること。また、前記短波長変換されたレーザ光は、前記 Nd : YAG の第5高調波であること。

【0010】前記パルス制御手段のパルス発生タイミングと、前記光学系からのレーザ光の前記標本上での位置決めするタイミングとの同期をとる手段とを備え、前記位置決めは前記第5高調波発生過程で生じる第2高調波を用いて行う遺伝子組替え用レーザ装置を構成する。

【0011】また、固体レーザ媒質と、前記固体レーザ媒質からのレーザ光をパルス制御する手段と、前記パルス制御された前記固体レーザ媒質からのレーザ光を短波調に変換する第1の非線形光学結晶と、前記第1の非線形光学結晶から波長変換されたレーザ光を更に短波調に変換する第2の非線形光学結晶と、前記固体レーザ媒質からのレーザ光と前記第2の非線形光学結晶からのレ

ザ光とを組み合わせたレーザ光を更に短波調に変換する第3の非線形光学結晶と、前記第3の非線形光学結晶からのレーザ光を集光するレンズとからなる光学系と、前記レンズによって集光されたレーザ光の集光点を標本細胞上の任意の位置に定める手段と、前記パルス制御手段のパルス発生タイミングと、前記光学系からのレーザ光の前記標本上での位置決めタイミングとの同期をとる手段と、前記標本の位置を検出する手段とで構成され、前記集光されたレーザ光により前記標本の細胞壁を穿孔する遺伝子組替え用レーザ装置を構成する。

【0012】形質転換させる標本細胞に対し、レーザ光を照射して前記標本の細胞壁を穿孔し、穿孔した孔から外因性遺伝子物質を入れた溶液を前記細胞内に注入することにより、前記外因性遺伝子のコード発現を行なう遺伝子組替え方法を用いる。前記レーザ光の波長は、 300 nm 以下の遠紫外光である。また、前記レーザ光は、固体レーザ媒質からのレーザ光の第5高調波とする。また、前記固体レーザ媒質は、半導体レーザ素子からのレーザ光により励起される Nd : YAG を用いて上記課題を解決する。

【0013】上述した構成によれば、 Nd : YAG レーザの第5高調波(213 nm)の光子エネルギーは 5.8 eV であり、C-Cの化学結合エネルギーの 3.2 eV よりは十分に大きく、かつ、一般に多くの植物は遠紫外光に対して極めて高い吸収率を有するため、前記レーザの第5高調波の光エネルギー密度がしきい値を越えると、所謂、曝触(アブレーション)が発生し、これを利用して高等植物の未成熟胚細胞を保護する、主としてセルロース($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$)からなる厚さ数 μm の固い細胞壁に容易に微小な孔を開けることができ、更に、細胞の熱的損傷、また光音響効果で生じる衝撃波に起因する損傷を極めて小さなレベルに止めることができる。

【0014】

【発明の実施の形態】本発明の実施の形態例について図1ないし図3を参照して説明する。図1は本発明による遺伝子組替え用レーザ装置の実施形態の一例を示す図であり、図2は本発明による遺伝子組替え用レーザ装置で細胞壁に孔を開けるべき植物試料の細胞を示す模式図であり、図3(a)は本発明による遺伝子組替え用レーザ装置で細胞壁に孔を開けるべき植物試料の細胞壁の断面を示す図であり、同図(b)は曝触による開口の過程を示す図である。

【0015】まず、図1を参照して本発明の遺伝子組替え用レーザ装置の構成と動作について説明する。符号10は波長 808 nm の半導体レーザであって、このレーザ光で、両端がミラー120、ミラー121で構成される共振器110内に配置される固体レーザ媒質の一例であるネオジウム・ヤグ結晶11を励起し、波長 1064 nm の赤外光を発振させる。符号12は音響光学素子であって、ネオジウム・ヤグ結晶11と同一の共振器内に

置かれ、共振器の損失を急速に変化させることによって、尖頭出力の高い短パルス光を発生させる。

【0016】第一の非線形光学結晶であるリチウム・トライボレイト(LBO)13に前記尖頭出力の高い短パルス光を入射して、第2高調波である波長532nmの緑色光を発生させると同時に波長1064nmの赤外光も出力する。つぎに、波長532nmの緑色光をミラー111、ミラー112で反射し、第二の非線形光学結晶であるベータ・バリウム・ボレイト(β-BBO)14に入射して波長266nmの紫外光を発生させ、更に、第三の非線形光学結晶であるベータ・バリウム・ボレイト(β-BBO)15ではベータ・バリウム・ボレイト14で発生させ、ミラー113で反射した波長266nmの紫外光と、リチウム・トライボレイト13から出力し、ミラー111、ミラー114を透過した波長1064nmの赤外光の和周波である波長213nmの紫外光を発生させ、試料への照射光とする。ベータ・バリウム・ボレイト15は波長213nmの紫外光を発生せると共に、532nmの緑色光も出力する。

【0017】ベータ・バリウム・ボレイト15から出力された波長213nmの紫外光は、ガルバノミラー等の偏向素子16で反射し、レンズ17を通って試料18上に集光する。ステージ19には試料18が設置され、その位置が調整される。ステージ19の移動は信号源21に接続されたコントローラ20により行われる。コントローラ20は同時に音響光学素子12をも制御するので、レーザーパルスと試料の位置決め同期を探ることができる。テレビカメラ22は試料18に集光するレーザスポットの位置決めの様子を監視するものであり、ベータ・バリウム・ボレイト15から出射し、試料18で反射した532nmの緑色光を検出する。

【0018】尚、試料へのレーザ集光位置の調整は、図示はしていないが、ステージ19による試料の位置決めに替えて、レーザ光を光学的手段、または、機械的手段によって、或いは前記2つの手段を合成した手段によって変位させても良いことは当然である。

【0019】図2は本発明の遺伝子組替え用レーザ装置で細胞壁に孔を開けるべき植物の細胞を示す模式図である。植物細胞として例えば形質転換させるための高等植物の未成熟胚、または分裂性盤状組織が用いられる。この植物細胞は核23、ミトコンドリア24、液胞25、葉緑体26、細胞膜27、細胞壁28から構成されている。

$$\begin{aligned} \text{フルエンス} &= \text{平均出力 (W)} \times \text{パルス幅 (sec)} \times \\ &= 400 \text{ (mW)} \times 50 \text{ n sec} / (\pi \times 0.5^2) \text{ } (\mu m^2) \\ &= 2.54 \text{ (J/cm}^2\text{)} \end{aligned}$$

である。また、波長213nmでは細胞壁28における光吸収も極めてよいから、曝触によって短時間で細胞壁28に孔33を開くことができる。また、波長200nm付近の光を用いることにより、生物細胞内のDNAの損傷を少なくすることができます。

る。

【0020】図3は本発明の遺伝子組替え用レーザ装置で孔を開けるべき植物の細胞壁28の断面と曝触(アブレーション)による孔33の形成過程を示す。細胞壁28はセルロース繊維30、ベクチン質31が交互に積層されている。この細胞壁28にレーザ装置が発生する波長213nmのレーザ光32により孔33があけられる。細胞壁28は同図からも分かるように、セルロース繊維30とベクチン質31との幾つかの層で強固に形成されていて、細胞構成要素を内包している。

【0021】前述したように、従来、粒子媒介形質転換においては、直径1.2μm程度のタンクステンや金粒子を細胞壁28(細胞膜27をも含めて)を打ち破って、物理的に打ち込む必要があった。これに対して本発明では図3(b)に示すように遠紫外光のレーザ光を細胞壁28に照射して孔33を開け、この孔33から溶液に入れられた外来性遺伝子を注入し、外来性遺伝子のコード発現を効果的に行うものである。

【0022】ここで、本発明に用いる波長213nmの遠紫外光の光子エネルギーは
 $\text{光子エネルギー} = 1.24 / \text{光の波長 } (\mu m)$
 $= 1.24 / 0.213$
 $= 5.8 \text{ (eV)}$

となり、有機体の基本構成であるC-Cの化学結合エネルギーである3.2eVよりも十分に大きな値となっている。

【0023】また、本発明者等により既に開発されている波長213nmのレーザは、平均出力400mWでパルス幅は50nsec、繰り返し周波数は7KHzで構成されている。従って、

$$\text{平均出力 (W)} = \text{尖頭値 (W)} \times \text{パルス幅 (sec)} \times \text{繰り返し周波数 (Hz)}$$

で表される式から、尖頭値が1(KW)以上の高い尖頭出力が得られていることが分かる。これらのデータから波長213nmの遠紫外レーザは本発明による装置の光源として用いて好適であることがわかる。

【0024】更に、本レーザ光は短波長、無収差、かつコヒーレンシーが良いため、NA=0.2程度の低開口数のレンズを用いても、回折で制限されるスポットサイズ=波長/開口数まで集光することができる。即ちNA=0.2のレンズで容易に1μm程度のスポットに集光することができるものであり、このときフルエンスは

$$\text{フルエンス} = \text{平均出力 (W)} \times \text{パルス幅 (sec)} / \text{照射面積 } (\text{cm}^2)$$

【0025】上述のように求められたフルエンス2.54(J/cm²)という値は、例えば角膜の屈折力異常の矯正に用いられるArFエキシマレーザ(波長193nm)と比較すると、その曝触速度がフルエンス50ないし250mJ/cm²で、0.5μm/パルスである

から、波長213nmにおいて2.54J/cm²のフルエンスがあれば、前記AxFエキシマレーザと同程度の曝触速度が厚さ数μmの細胞壁28に対して得られ、1ないし数パルスで直径1μm程度の孔を細胞壁28に貫通させることができ十分に可能となるものである。

【0026】

【発明の効果】従って本発明の遺伝子組替え用レーザ装置を用いることによって、銃砲、火薬等の危険物の取り扱いが不要となり、安全性が高く、また、細胞に与える損傷を小さく押さえることができて効率的に遺伝子組替え用試料を作成することができる。更に、波長213nmの遠紫外光の発生過程で得られる波長532nmの緑色光を用いて、細胞壁にあける孔の位置を正確に決めることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明による遺伝子組替え用レーザ装置の実施形態の一例を示す図である。

【図2】 本発明による遺伝子組替え用レーザ装置で細

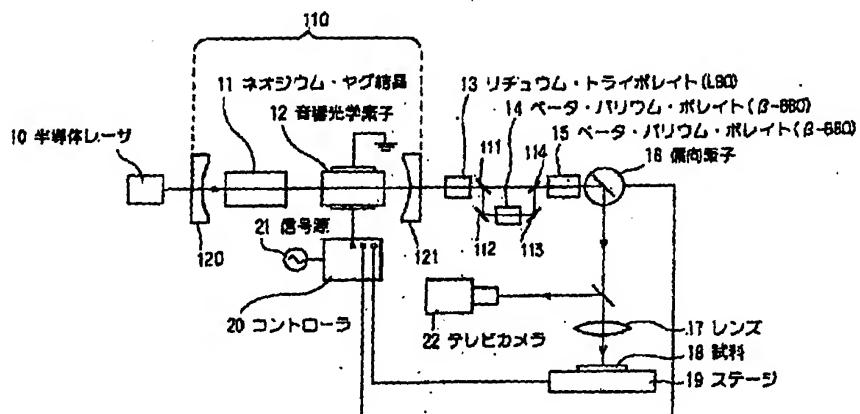
胞壁に孔を開けるべき植物試料の細胞を示す模式図である。

【図3】 (a) は本発明による遺伝子組替え用レーザ装置で細胞壁に孔を開けるべき植物試料の細胞壁の断面を示す図であり、(b) は曝触による開口の過程を示す図である。

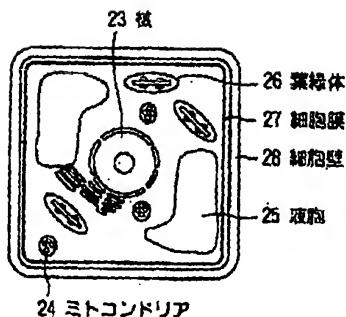
【符号の説明】

10…半導体レーザ、11…ネオジウム・ヤグ結晶、12…音響光学素子、13…リチウム・トライポレイテ(LBO)、14, 15…ペータ・バリウム・ポレイテ(β -BBO)、16…偏向素子、17…レンズ、18…試料、19…ステージ、20…コントローラ、21…信号源、22…テレビカメラ、23…核、24…ミトコンドリア、25…液胞、26…葉緑体、27…細胞膜、28…細胞壁、30…セルロース繊維、31…ペクチン質、32…レーザ光、33…孔、110…共振器、111, 112, 113, 114…反射鏡、115…吸収素子

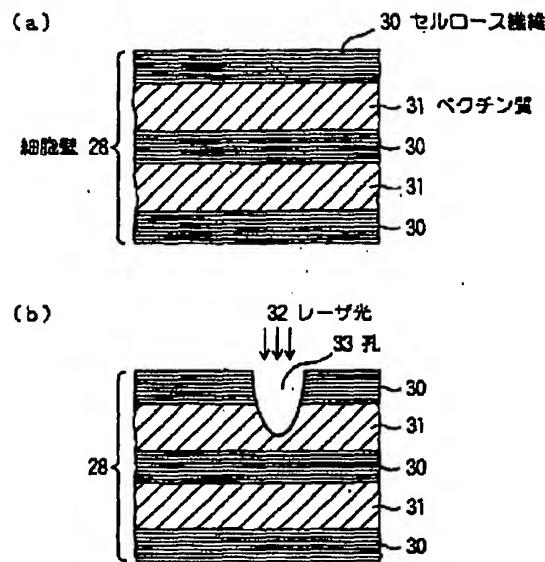
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6
// B 23 K 26/00識別記号 庁内整理番号 F I
C 12 N 5/00技術表示箇所
C